

# CoviDetect™

## COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay

*In Vitro* diagnostisk Assay for detektion af SARS-CoV-2  
Brugervejledning

Læs venligst disse instruktioner grundigt før brug af PentaBases CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RTq-PCR Assay. Det anbefales at gemme *Brugervejledning* så manualen kan bruges fremover. Købere af PentaBases CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er kun lovet retten til brug, men ikke generelle licens- eller patentrettigheder.

**CoviDetect™** er et varemærke af PentaBase ApS

PentaBase Aps  
Petersmindevej 1A  
DK-5000 Odense  
[www.pentabase.com](http://www.pentabase.com)

Version 3.1  
Senest revideret: March 2021



## Indholdsfortegnelse

1. Anvendelsesformål.....	1
2. Resume og forklaring af analysen.....	1
2.1 Baggrund for anvendelse .....	1
2.2 Beskrivelse af assayet.....	1
2.3 Principperne bag procedurene .....	1
3. Reagenser og materialer.....	2
3.1 CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay reagenser og kontroller.....	2
3.2 Opbevaring og håndtering af reagenser.....	3
3.3 Andre nødvendige materialer .....	4
3.4 Instrumenter der skal anvendes .....	4
4. Forholdsregler og håndteringskrav.....	4
5. Prøveindsamling, transport og opbevaring.....	5
5.1 Prøveindsamling.....	5
5.2 Transport og opbevaring .....	5
6. Brugervejledning .....	5
6.1 Bemærkninger til proceduren .....	5
6.2 Reagensforberedelse .....	5
6.2.1 Dispense-Ready .....	5
6.2.2 Ready-To-Use .....	5
6.2.3 Positive og negative kontroller.....	5
6.3 Kørsel af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR Assay .....	5
7. Dataanalyse .....	6
7.1 Instruments.....	6
7.2 Baseline- og tærskelværdiindstillinger .....	6
7.3 Fortolkning af resultater.....	6
7.3.1 Positiv prøve .....	7
7.3.2 Negativ prøve .....	7
7.3.3 Inkonklusiv prøve.....	7
8. Evaluering af ydeevne.....	7
8.1 Analytisk sensitivitet - Detektionsgrænse .....	7
8.2 Inklusivitet.....	8
8.3 Analytisk specificitet .....	9
8.3.1 Danske cases .....	10
8.4 Klinisk evaluering.....	11
8.4.1 Kohorte 2 .....	13
9. Begrænsninger.....	14
10. Troubleshooting .....	15
11. Bortskaffelse .....	15

12. Symboler .....	15
13. Producenter og distributører .....	15

## 1. Anvendelsesformål

CoviDetect™ COVID-19 Mutation RT-qPCR diagnostiske assays er en RT (revers transkriptase) qPCR-analyse beregnet til påvisning af nukleinsyrer fra SARS-CoV-2 virus. SARS-CoV-2 RNA kan findes i biologisk materiale fra øvre eller nedre luftveje hos smittede personer. Prøverne kan tages ved henholdsvis næse- eller svælgpodning eller fra en spytprøve.

Resultaterne er til påvisning af SARS-CoV-2 RNA. Positive resultater indikerer en infektion med SARS-CoV-2 virus, men udelukker ikke muligheden for co-infektion med andre vira eller bakterier. Bemærk venligst at SARS-CoV-2 kan forekomme uden symptomer.

Negative PCR-resultater udelukker ikke nuværende eller fremtidig smitte med SARS-CoV-2 virus, og resultatet skal altid kombineres med kliniske observationer, sygdomshistorik og epidemiologisk information.

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er beregnet til brug af sundhedspersonale eller kvalificeret laboratoriepersonale som er særligt instrueret og oplært i teknikkerne bag qPCR og kompetente i håndtering af biologiske prøver

*Brugervejledningen eller Quick guiden* kan også downloades på vores hjemmeside: [www.pentabase.com](http://www.pentabase.com)

## 2. Resume og forklaring af analysen

### 2.1 Baggrund for anvendelse

Den 31. december 2019 advarede Kina, Verdenssundhedsorganisationen (WHO), om flere tilfælde af usædvanlig lungebetændelse i byen Wuhan. Denne infektion har siden vist sig at være forårsaget af ny coronavirus, senere kaldet SARS-CoV-2 (svær akut respiratorisk syndrom coronavirus-2). Coronarussygdommen 2019 (COVID-19) er blevet erklæret for en international sundhedskrise og har forårsaget millioner af bekræftede infektioner hos mennesker. COVID-19 er den første pandemi forårsaget af coronavirus, og med sin høje smitterate og potentielle fare har den resulteret i en signifikant verdensomspændende sygdomsrate samt dødelighed over hele verden.

Korrekt diagnose af SARS-CoV-2 er vigtig hos personer der mistænkes for at have en respiratorisk infektion. CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er et molekylært *in vitro* diagnostisk assay baseret på PentaBases højsensitive teknologi, der bruges til at identificere tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 RNA hos enkeltpersoner. Assayet er udviklet i et multiplexformat, hvilket betyder, at en prøve fra én patient kan analyseres i ét rør.

### 2.2 Beskrivelse af assayet

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet kombinerer qPCR med PentaBases nye og selektive teknologier som består af både standard-syntetiske oligonukleotider såvel som egne modificerede syntetiske oligonukleotider såsom HydrolEasy™ prober og SuPrimers™. Herved opnås specifik og følsom amplifikation. Teknologien kan anvendes til mange forskellige qPCR-instrumenter, samt til PentaBases egen portefølje af instrumenter ved brug af standardprocedurer. PentaBase-modificerede oligoer indeholder syntetiske DNA-analoger bestående af et fladt heteroaromatisk og hydrofobisk molekyle samt en linker. Under syntese indsættes disse modifikationer i oligonukleotiderne på fikserede positioner. Ved brug af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet, kan tilstedeværelsen af viralt RNA i en prøve detekteres hurtigt, sensitivt og selektivt med RT-qPCR-analyse.

En HydrolEasy™ probe er lig en standard probe der hydrolyseres (også kendt som en TaqMan® probe), mærket med en fluorefor ved 5'-enden og en quencher ved 3'-enden, men er baseret på PentaBase-modificerede oligoer. Det giver proben en signifikant bedre signal/støj-ratio, højere specificitet samt højere følsomhed sammenlignet med andre konventionelle hydrolyse-prober. HydrolEasy™ prober i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er mærket med enten FAM™, HEX™, Texas Red™ eller Cy5™.

SuPrimers™ er standard DNA-primere som er modificerede med en eller flere PentaBaser. Pentabaser giver øget specificitet og sensitivitet samt reducerer forekomsten af primer-dimere.

### 2.3 Principperne bag procedurene

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet køres på et qPCR-instrument for nukleinsyreampifikation og detektion af en target-sekvens i biologiske prøver.

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet leveres som enten Dispense Ready (DR) eller Ready-To-Use (RTU) versioner. Dispense Ready-versionen indeholder Primer-Probe Mix og Master Mix i separate rør, klar til at blive overført til

egne beholdere inden tilsætning af RNA. Ready-To-Use versionen er pre-overført til 8-rørs regulær profil (0,2 ml) eller lav profil (0,1 ml) PCR-strips og skal kun tilsættes RNA inden amplifikation.

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet targeterer to virale sekvenser af SARS-CoV-2 nukleokapsidprotein-genet (Kaldet N1 og N2). Selektiv amplifikation af N1 og N2-sekvenser opnås ved at bruge sekvensspecifikke forward og revers primere med HydrolEasy™ prober mærket med henholdsvis FAM™ eller HEX™. Selektiv amplifikation af det interne kontrol RNA opnås ved non-kompetitiv, sekvensspecifik forward og revers primere bestående af en Cy5™-mærket HydrolEasy™ probe, som er ikke-homolog med det virale coronavirusgenom. Det amplificerede target detekteres ved kløvning af de fluorescens-mærkede oligonukleotid-prober som specifikt targeterer sekvensen for SARS-CoV-2 eller sekvensen af interesse. Et varme- og inhibitorresistent RT-enzym, kombineret med et termostabilt DNA polymerase-enzym, bruges til revers transskription samt efterfølgende amplifikation.

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet indeholder SARS-CoV-2 RNA positive og negative kontrolprøver, hvilke skal inkluderes i RNA-ekstraktions-proceduren samt i hver RT-PCR-kørsel for validering af det komplette workflow.

**Tabel 1.** Liste over detekterede regioner i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet

Targeteret Region	Gen	Fluorofor
N1	Nukleokapsidprotein genmarkør	FAM™
N2	Nukleokapsidprotein genmarkør	HEX™
RNP	Human RNase P (Ekstraktionskontrol)	Cy5™

### 3. Reagenser og materialer


Materialerne inkluderet i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay kan ses i Tabel 2. Materialer som skal anvendes, men som ikke er inkluderet i kittet kan ses i Tabel 4 og 5. Reagenshåndtering og opbevaring kan ses i Tabel 3.


Reference til sektionen med **Reagenser og materialer** og **Forholdsregler og håndteringskrav**

#### 3.1 CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay reagenser og kontroller

Alle uåbnede assay-rør og Master Mix skal opbevares som anbefalet i Tabel 3.

**Tabel 2.** Liste over materialer inkluderet i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay.

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay Dispense Ready (DR)		
Komponenter	Reagenser	Sikkerhedssymbol og advarsler
COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay	Syntetisk DNA	Ikke relevant
AmpliSmaRT™ One Step RT-qPCR Master Mix	Ikke relevant	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel
SARS CoV-2 RNA positiv kontrol	Tris buffer, EDTA, Guanidinium Thiocyanate, 0.125% SDS	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel    <b>FARE</b> H302+H332 Farlig ved indtagelse eller indånding H314 Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader EUH032 Kontakt med syrer frigiver meget giftig gas. P280 Brug beskyttende handsker/beskyttende tøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

		P304+P340+P312 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejrtrækningen lettes. Kontakt GIFTLINJEN/læge i tilfælde af ubehag. VED KONTAKT MED ØJNE fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Forsæt skylning. Kontakt øjeblikkeligt GIFTLINJEN/læge.  593-84-0 Guanidinium Thiocyanate
SARS CoV-2 RNA Negativ kontrol	DNase/RNase-frit medie	Ikke relevant
<b>CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay</b> Ready-To-Use (RTU)		
<b>Kitkomponenter</b>	<b>Reagenser</b>	<b>Sikkerhedssymboler og advarsler</b>
COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay	Syntetisk DNA	Ikke relevant
SARS CoV-2 RNA Positiv kontrol	Tris buffer, EDTA, Guanidinium Thiocyanate, 0.125% SDS	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel   <b>FARE</b> H302+H332 Farlig ved indtagelse eller indånding H314 Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader EUH032 Kontakt med syrer frigiver meget giftig gas. P280 Brug beskyttende handsker/beskyttende tøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. P304+P340+P312 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejrtrækningen lettes. Kontakt GIFTLINJEN/læge i tilfælde af ubehag. VED KONTAKT MED ØJNE fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Forsæt skylning. Kontakt øjeblikkeligt GIFTLINJEN/læge.  593-84-0 Guanidinium Thiocyanate
SARS CoV-2 RNA Negativ kontrol	DNase/RNase-frit medie	Ikke relevant

### 3.2 Opbevaring og håndtering af reagenser

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet transporteres på tøris eller frosne isklumper. Reagenser skal opbevares og håndteres, som angivet i Tabel 3, straks ved ankomst. CoviDetect™ Multiplex RT-qPCR Assay skal opbevares i original emballage og er stabilt i op til 7 måneder ved -20°C. Reagenser der har overskredet sidste anvendelsesdato, som er angivet på pakken, skal ikke anvendes. Kontakt venligst PentaBase hvis produktets beskyttende emballage er beskadiget ved modtagelsen eller har været transporteret ved ukorrekt temperatur. Vær opmærksom på udløbsdatoen angivet på pakkens etikette. Reagenserne skal bortskaffes efter instruktionerne i Sektion 11.

Ved anvendelse skal assayets komponenter returneres til fryseren direkte efter brug for at minimere tiden ved stuetemperatur. Gentagende optøninger skal holdes på et minimum og bør ikke overstige 12 fryse-tø cyklusser.

**Tabel 3.** Reagensopbevaring og reagensudløbsbetingelser

Reagens	Opbevaringstemperatur	Opbevaringstid
CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay (DR)	-20°C to -80°C	Stabil indtil indikeret udløbsdato

AmpliSmaRT™ One Step RT-qPCR Master Mix	-20°C to -80°C	Stabil indtil indikeret udløbsdato
CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay (RTU)	-20°C to -80°C	Stabil indtil indikeret udløbsdato
CoviDetect™ SARS CoV-2 RNA Positiv Kontrol	-20°C	Stabil indtil indikeret udløbsdato
CoviDetect™ SARS CoV-2 RNA Negativ Kontrol	-20°C	Stabil indtil indikeret udløbsdato

### 3.3 Andre nødvendige materialer

Tabel 4. Materialer og forbrugsvarer som skal anvendes, men ikke inkluderet i kittet

<b>Materialer</b>
Plastikvarer kompatible med PCR-instrumentet <sup>1</sup>
Pipettespidser
Centrifuge til at spinne rør
Nukleasefrit H <sub>2</sub> O
<b>Prøveindsamling-kits</b>
Nasopharyngeal podning
Nasal podning
<b>Ekstraktions-kit</b>
Viral DNA/RNA Ekstraktions-kit

### 3.4 Instrumenter der skal anvendes

Tabel 5. Instrumenter

<b>Udstyr</b>
Nukleinsyre-ekstraktionssystem
qPCR-instrument (tre kanaler)

## 4. Forholdsregler og håndteringskrav

### 4.1 Advarsler og forholdsregler

- Til *in vitro* anvendelse.
- Omgå alt biologisk prøvemateriale, inklusiv brugte CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay-rør og pipetter, med forsigtighed da de kan overføre eventuelle infektioner. Alt biologisk materiale skal håndteres efter universelle forholdsregler, da det ofte er umuligt at vide hvilke prøver der er infektiøse.
- Følg din institutions sikkerhedsprocedurer når der arbejdes med kemikalier og biologisk prøvemateriale.
- God laboratorieadfærd og grundig overholdelse af procedurerne udspecificeret i denne *Brugervejledning* er nødvendig. Brug laboratoriekitter, laboratoriehandsker og øjenbeskyttelse ved håndtering af biologiske prøver og reagenser. Handskerne skal skiftes imellem håndtering af hver biologiske prøve for at undgå kontaminering.
- Fjern handsker og vask hænder grundigt efter håndtering af biologiske prøver og reagenser.
- Brug ikke beskadigede CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay rør.
- Brug ikke CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay pre-overført i et Ready-To-Use rør hvis det har været tabt under åbning.
- Åbn ikke rørene under eller efter amplificering i PCR-programmet.
- For yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer, for at mindske kontamineringsrisiko ved Nucleic Acid Extraction System eller qPCR-instrumentet, skal henvendelse rettes til de respektive brugervejledninger.
- Bortskaffelse af brugte CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay rør, pipetter og rør med prøvemateriale skal ske efter lokale og statslige regulativer for risikoaffald.
- Sikkerhedsdataark er tilgængelige, ved efterspørgsel, hos din lokale PentaBase-repræsentant.
- Grundet den høje sensitivitet i analyserne kan kontaminering af arbejdsområdet, fra tidligere prøver, være skyld i falske resultater. Vær derfor ekstra opmærksom på, ikke at kontaminere reagenser og at håndtering af alle prøver sker efter standard laboratorieprocedurer.
- Grundet tilstedeværelsen af HydrolEasy™ prober skal CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay beskyttes mod lys.

<sup>1</sup> Dispense version only



- Reagenserne skal ikke fortyndes til en lavere koncentration end det er angivet i protokollen. Dette har indflydelse på analysen.
- Udskift ikke reagenserne med andet, da det kan påvirke analysen.
- Prøveindsamling skal udføres ved godkendte podningsmetoder som anbefalet i Tabel 4. Utilstrækkelig eller uhensigtsmæssig prøveindsamling, opbevaring og/eller transport kan føre til ukorrekte eller inkonklusive resultater. BRUG IKKE podepinde lavet af bomuld eller calciumalginat, eller podepinde med træskaft.
- Det skal sikres at der ikke er tegn på lækage fra prøverørene inden analysen foretages.

## 5. Prøveindsamling, transport og opbevaring

**Bemærk:** Alt biologisk materiale samt kontroller skal håndteres som er det prøver der kan overføre smitte.

### 5.1 Prøveindsamling

Prøvematerialet skal være nasopharyngeale eller oropharyngeale podninger eller spytpøver. Ineffektive eller uhensigtsmæssig prøveindsamling kan give falske testresultater. Undervisning i podning er derfor anbefalet for at sikre den bedste kvalitet.

### 5.2 Transport og opbevaring

- Transport af indsamlede prøver skal overholde alle gældende regulativer for transport af biologisk materiale.
- Biologiske prøver kan opbevares i egnede buffere ved 2-8°C i op til 72 timer efter indsamling.
- Hvis levering og bearbejdning overskrider 72 timer, skal de biologiske prøver opbevares ved -70°C eller lavere.
- Ekstraheret RNA skal altid opbevares ved -70°C eller lavere.

## 6. Brugervejledning

### 6.1 Bemærkninger til proceduren

- Brug ikke CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR Assays eller AmpliSmaRT™ One-Step RT-qPCR Master Mix, SARS CoV-2 RNA Positiv kontrol eller SARS CoV-2 RNA Negativ kontrol efter udløbsdatoen.
- Genanvend ikke komponenterne. De er kun til engangsbrug.

### 6.2 Reagensforberedelse

#### 6.2.1 Dispense-Ready

- a. Tilsæt **10 µl** 2x AmpliSmaRT™ One-Step RT-qPCR Master Mix til hvert PCR-rør/brønd.
- b. Tilsæt **5 µl** 4x multiplex primer/probe mix til hvert PCR-rør/brønd.
- c. Tilsæt **5 µl** af templatens til hvert PCR-rør/brønd. Én patient analyseres i et enkelt PCR-rør/brønd.
- d. Luk alle PCR-strips

#### 6.2.2 Ready-To-Use

- a. Spin alle PCR-strips eller plader inden tilsætning af template, for at sikre at alle reagenser samles i bunden.
- b. Tilsæt **5 µl** af templatens til hvert PCR-rør/brønd. Én patient analyseres i ét enkelt PCR-rør/brønd.
- c. Luk alle PCR-strips.

#### 6.2.3 Positive og negative kontroller

Positive kontroller (20 kopier/µl) og negative kontroller er inkluderet i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay. Tilføj 200 µl til RNA-ekstraktionsproceduren.

**Bemærk:** Den positive kontrol indeholder Guanidine thiocyanate og SDS og kan ikke tilsættes direkte til CoviDetect™ COVID-19 Mutation RT-PCR Assays men skal igennem en nukleotid-ekstraktionsproces først.

### 6.3 Kørsel af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR Assay

- a. Spin PCR-strips eller plader (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm) for at sikre at alle reagenser samles i bunden af strips/brønde og for at undgå luftbobler i prøverne. Placer PCR-strips eller plader i qPCR-instrumentet og kør programmet som er vist i Tabel 6.

Tabel 6. RT-qPCR protokol til kørsel af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay.

Protokol	Temperatur [°C]	Tid [sek]	Cycler	Stigning [°C/sek]	Kanal
<b>Stage 1</b>					
Hold	52	300	1	2	
<b>Stage 2</b>					
Hold	95	10	1	2	
<b>Stage 3 (Cycle 1-7)</b>					
2-step amplificering	95	5	7	2	
	66	30		2	
<b>Stage 4 (Cycle 1-38)</b>					
2-step amplificering	95	5	38	2	FAM™ (grøn)
	60	30		2	HEX™/VIC (gul) Cy5™ (rød)

## 7. Dataanalyse

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay, som bestemmer cyklus-tærskelværdien (Ct), er en central del af dataanalyseprocessen. Ct er defineret som den cyklus, hvorved det fluorescerende signal for et givet assay krydser tærskelværdien, som er fastsat som en del af analyseprocessen. Ct-værdierne fra PCR-programmets Stage 4 sammenlignes med prædefinerede cutoff-værdier for at bestemme om den individuelle prøve er positiv eller negativ for SARS-CoV-2 (Sektion 8.3).

### 7.1 Instruments

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er designet til at køre på åbne platforme og er nyligt blevet valideret på BaseTyper™ (PentaBase), CFX96 (BioRad) og LightCycler® 480 II (Roche) qPCR-instrumenter. Optimale PCR-profiler er udviklet for hvert valideret instrument. Skriv venligst til [info@pentabase.com](mailto:info@pentabase.com) for opdateret instrument-specifikke instruktioner til brug. For at køre CoviDetect™ COVID-19 Multiplex qRT-PCR Assay på andre instrumenter, skal du selv validere dine indstillinger. Det anbefales at der laves en specifik validering ved at anvende prøver fra patienter og syntetiske kontroller for at sætte tærskelværdi og cut-offs korrekt. Kontakt venligst PentaBase eller din lokale distributør for support.

### 7.2 Baseline- og tærskelværddiindstillinger

Resultater fra CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR kan analyseres ved brug af både automatisk og manuel baseline- og tærskelværddiindstillinger. Hvis automatisk baseline og tærskelværddiindstillinger bruges, anbefales det også at lave en visuel inspektion af amplifikationskurverne da der, i nogle tilfælde, er behov for manuel justering af baseline og/eller tærskelværdi pga. baselineafvigelse eller ukorrekt baselining. Når baseline indstilles manuelt, anbefales det at bruge intervaller af 5, fx fra cyklus 10 til 15, afhængig af amplifikationskurven for prøven. Når tærskelværdien indstilles manuelt, skal tærsklen indstilles til at krydse i starten af den eksponentielle PCR-fase og over enhver baggrunds- eller baselinefluorescens. Hvis der er signifikant baggrunds- eller baselinefluorescens, så skal baselineintervallet justeres. Se eventuelt troubleshooting-sektionen (Sektion 10) for flere forslag til at rette forkerte analyseindstillinger.

### 7.3 Fortolkning af resultater

I Tabel 7 er vist en oversigt over mulige resultater af analysen. Resultaterne er kun valide såfremt den inkluderede positive kontrol har en Ct-værdi under 35 for N1 og N2, samt under 28 for RNase P intern kontrol. No template (NTC) negativ kontrol skal ikke have en Ct-værdi. Ct cutoff-værdier for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er vist i Tabel 8.

Tabel 7. Analyseresultater baseret på target-amplifikationskurver. Konklusioner er baseret på target Ct-værdier, som sammenlignes med cut-offs vist i tabel 8.

Target	Positiv Case 1	Positiv Case 2 <sup>2</sup>	Positiv Case 3	Positiv Case 4	Negativ	Inkonklusiv
RNase P	+	-	+	+	+	-
N1	+	+	-	+	-	-
N2	+	+	+	-	-	-

**Tabel 8.** Ct cut-off-værdier for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay.

Fortolkning af RT-qPCR resultater (Stage 4)			
Assay	Ct	Konklusion	Kommentar
N1	<35	SARS-CoV-2 positiv	Ct-værdier skal være under 35 for både N1 og N2 for at prøven kan konkluderes værende positiv for SARS-CoV-2.
N2	<35		
RNase P	<28	SARS-CoV-2 positiv	Prøven kan konkluderes positiv hvis kun N1 er positiv og RNase P er positiv.
N1	<35		
N2	≥35		
RNase P	<28	SARS-CoV-2 positiv	Prøven kan konkluderes positiv hvis kun N2 er positiv og RNase P er positiv.
N1	≥35		
N2	<35		
RNase P	<28	SARS-CoV-2 negativ	Et positivt RNase P signal er nødvendigt for at konkludere prøven som negativ.
N1	≥35		
N2	≥35		
RNase P	≥28	Inkonklusiv	Prøven indeholder ikke nok materiale til at kunne konkludere noget. Hvis muligt, tag en ny prøve.
N1	≥35		
N2	≥35		

### 7.3.1 Positiv prøve

Prøven betragtes som positiv for SARS-CoV-2 når Ct-værdierne for både det virale N1 og N2 RNA er under 35. Bemærk venligst at RNase P-signalet kan være undertrykt i nogle prøver og i særdeleshed når prøven indeholder store mængder af viralt RNA. Disse prøver betragtes som valide hvis Ct-værdien for både N1 og N2 er under 35, også selvom RNase P er negativ.

Prøven betragtes også som positiv hvis enten N1 eller N2 er positiv, når RNase P er positiv. Mangel på signal fra enten N1 eller N2 kan skyldes mutationer i target-regionerne i assayet. I tilfælde af en bekræftet positiv prøve, hvor der kun er signal i enten N1 eller N2, anbefales det at sende prøven til sekventering samt rapportere den muterede stamme til [support@pentabase.com](mailto:support@pentabase.com).

### 7.3.2 Negativ prøve

Prøven betragtes som negativ for detektering af SARS-CoV-2, hvis prøven er positiv for RNase P men negativ for N1 og N2.

### 7.3.3 Inkonklusiv prøve

I tilfælde af ingen eller sen amplificering af RNase P (Ct≥28) betragtes testen som inkonklusiv, medmindre både N1 og N2 er positive (Ct < 35). Hvis der er mere materiale tilgængeligt, gentag da ekstraktionsprocessen og kør testen igen. Hvis alle markører forbliver negative, kan der ikke konkluderes på prøven, og det anbefales derfor, hvis muligt, at tage en ny prøve.

## 8. Evaluering af ydeevne

### 8.1 Analytisk sensitivitet - Detektionsgrænse

Grænsen for detektering af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er blevet evalueret ved at tilsætte syntetisk SARS-CoV-2 RNA (Twist Bioscience, Cat. no. 102015) til en negativ klinisk oropharyngeal matrix. Baseret på en indledende fortyndingsserie, blev 7000 og 3500 kopier af SARS-CoV-2 RNA tilsat i 3 ml af 20 oropharyngeale prøver. RNA blev ekstraheret ved anvendelse af et BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument og viral DNA/RNA extraction kit (Tabel 9).

<sup>2</sup> RNase P signalet kan være undertrykt når N1 og N2 er positive. Især i prøver med høj mængde viralt RNA

**Tabel 9.** Detektionsgrænse for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af SARS-CoV-2 RNA tilsat til en oropharyngeal matrix. RNA blev ekstraheret ved brug af BasePurifier™ nucleic acid extraction instrumentet.

Instrument	Måling	N1		N2		N1 or N2	
BaseTyper™	RNA (kopier per ekstraktion)	500	250	500	250	500	250
	RNA koncentration (kopier/μl)	2.5	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25
	Positiv/Total	20/20	18/20	20/20	18/20	20/20	19/20
	Middel Ct (Stage 4)	30.0	31.1	28.5	29.2	NA	NA
	Standardafvigelse (Ct)	1.2	1.7	1.1	1.9	NA	NA
CFX96	RNA (kopier per ekstraktion)	500	250	500	250	500	250
	RNA koncentration (kopier/μl)	2.5	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25
	Positiv/Total	20/20	17/20	20/20	18/20	20/20	19/20
	Middel Ct (Stage 4)	28.3	28.7	27.2	27.8	NA	NA
	Standardafvigelse (Ct)	1.0	1.7	0.9	1.9	NA	NA
LightCycler® 480	RNA (kopier per ekstraktion)	500	250	500	250	500	250
	RNA koncentration (kopier/μl)	2.5	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25
	Positiv/Total	20/20	16/20	19/20	15/20	20/20	16/20
	Middel Ct (Stage 4)	29.2	30.5	30.0	29.7	NA	NA
	Standardafvigelse (Ct)	2.6	1.4	1.2	0.7	NA	NA

Ved brug af BaseTyper™ qPCR-instrument og uafhængigt af ekstraktionsmetoden, blev detektionsgrænsen for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay bestemt ved brug af SARS-CoV-2 RNA (Twist Bioscience, Cat. no. 102015) fortyndet i en 25ng wild type human genomisk DNA-baggrund (Tabel 8).

**Tabel 10.** Detektionsgrænsen for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af SARS-CoV-2 RNA tilsat til wild type human DNA. RT-qPCR af SARS-CoV-2 RNA blev udført ved brug af BaseTyper™ instrumentet.

RNA (kopier per reaktion)	Observationer (n)	Assay	Positiv	Positiv (%)
0	18	N1	0	0
		N2	0	0
		N1 eller N2	0	0
1	12	N1	2	17
		N2	2	17
		N1 eller N2	2	17
5	30	N1	19	63
		N2	19	63
		N1 eller N2	21	70
10	36	N1	27	75
		N2	31	86
		N1 eller N2	32	89
20	28	N1	21	75
		N2	26	93
		N1 eller N2	27	96
50	10	N1	10	100
		N2	10	100
		N1 eller N2	10	100
100	8	N1	8	100
		N2	8	100
		N1 eller N2	8	100

## 8.2 Inklusivitet

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex Assay oligosekvenser er blevet alignet med Global SARS-CoV-2 sekvenser fra GISAID (excluding Denmark). Mismatch-frekvensen blev fundet at være mindre end 5%.

**N1 Forward Primer**

GACCCCAAAATCAGCGAAAT

```

||||| >hCoV-19/USA/WA-UW112/2020|EPI_ISL_416650|2020-03-10
||||| >hCoV-19/pangolin/Guangdong/1/2019|EPI_ISL_410721|2019
||||| >hCoV-19/Netherlands/ZuidHolland_28/2020|EPI_ISL_415532|2020-03-09
||||| >hCoV-19/Senegal/026/2020|EPI_ISL_418209|2020-03-03
||||| >hCoV-19/Foshan/20SF207/2020|EPI_ISL_406534|2020-01-22
||||| >hCoV-19/bat/Yunnan/RaTG13/2013|EPI_ISL_402131|2013-07-24
||||| >hCoV-19/USA/WA-UW112/2020|EPI_ISL_416650|2020-03-10
||||| >hCoV-19/pangolin/Guangdong/1/2019|EPI_ISL_410721|2019
||||| >hCoV-19/Netherlands/ZuidHolland_28/2020|EPI_ISL_415532|2020-03-09
||||| >hCoV-19/Senegal/026/2020|EPI_ISL_418209|2020-03-03
||||| >hCoV-19/Foshan/20SF207/2020|EPI_ISL_406534|2020-01-22
||||| >hCoV-19/bat/Yunnan/RaTG13/2013|EPI_ISL_402131|2013-07-24

```

**N1 Revers Primer**

CGCAGTATTATTGGGTAAACC

*Ingen mismatches fundet***N1 Probe**

ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC

```

||||| >hCoV-19/USA/TX_2967/2020|EPI_ISL_420798|2020-03-01
||||| >hCoV-19/France/ARA11997/2020|EPI_ISL_419176|2020-03-21
||||| >hCoV-19/Tianmen/HBCDC-HB-07/2020|EPI_ISL_412983|2020-02-08
||||| >hCoV-19/Australia/VIC41/2020|EPI_ISL_419760|2020-03-11
||||| >hCoV-19/USA/TX_2967/2020|EPI_ISL_420798|2020-03-01
||||| >hCoV-19/France/ARA11997/2020|EPI_ISL_419176|2020-03-21
||||| >hCoV-19/Tianmen/HBCDC-HB-07/2020|EPI_ISL_412983|2020-02-08
||||| >hCoV-19/Australia/VIC41/2020|EPI_ISL_419760|2020-03-11

```

**N2 Forward primer**

AGGAACTGATTACAAACATTGGC

```

||||| >hCoV-19/Estonia/ChVir1985/2020|EPI_ISL_420067|2020-03
||||| >hCoV-19/pangolin/Guangdong/1/2019|EPI_ISL_410721|2019

```

**N2 Revers Primer**

TGTAGGTCAACCACGTTCCC

```

||||| >hCoV-19/USA/WI-43/2020|EPI_ISL_421301|2020-03-19
||||| >hCoV-19/Hungary/2/2020|EPI_ISL_418183|2020-03-17

```

**N2 Probe**

TGCACAATTTGCCCCAGCG

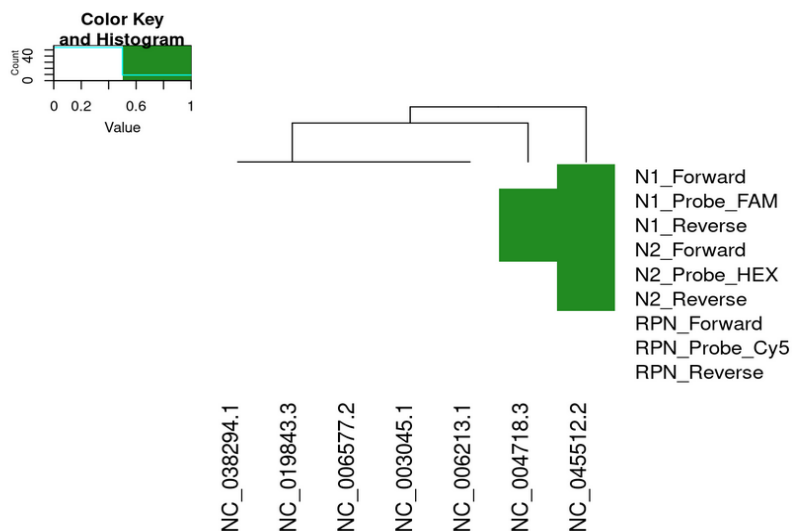
```

||||| >hCoV-19/Wales/PHWC-255AC/2020|EPI_ISL_421008|2020-03-23
||||| >hCoV-19/Iceland/30/2020|EPI_ISL_417773|2020-03-03
||||| >hCoV-19/Chongqing/YC01/2020|EPI_ISL_408478|2020-01-21
||||| >hCoV-19/bat/Yunnan/RaTG13/2013|EPI_ISL_402131|2013-07-24

```

**8.3 Analytisk specificitet**

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex Assay oligosekvenser er blevet alignet med almindelige Betacoronavira. Potentiel binding af N1 assayet til den originale SARS coronavirus (SARS-CoV) kan kun ske, når der er mindre end 5 mismatches inkluderet. Efterfølgende wet-test af krydsaktivitet til SARS-CoV blev fundet negativ.



**Figur 1.** In silico analyse af kryds-aktivitet mellem betacoronavira og almindelig forkølelse. NC\_038294.1: Betacoronavirus England 1, NC\_019843.3: Middle East Respiratory syndrome coronavirus, NC\_006577.2: Human coronavirus HKU1, NC\_003045.1: Bovine coronavirus, NC\_006213.1: Human coronavirus OC43 strain ATCC VR-759, NC\_004718.3: SARS coronavirus, NC\_045512.2: SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

### 8.3.1 Danske cases

CoviDetect™ COVID-19 Multiplex Assay oligosekvenser er blevet alignet med +300 danske SARS-CoV-2 sekvenser fra GISAID. I targetsekvenserne for N1 og N2 proberne blev der identificeret henholdsvis to og en mutation(er).

#### N1 Forward Primer

GACCCCAAAATCAGCGAAAT

*Ingen mismatches fundet*

#### N1 Revers Primer

CGCAGTATTATTGGGTAAACC

*Ingen mismatches fundet*

#### N1 Probe

ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC

#### En dansk stamme er blevet identificeret med et indsat T ved position 23:

ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC | N1\_Probe\_FAM

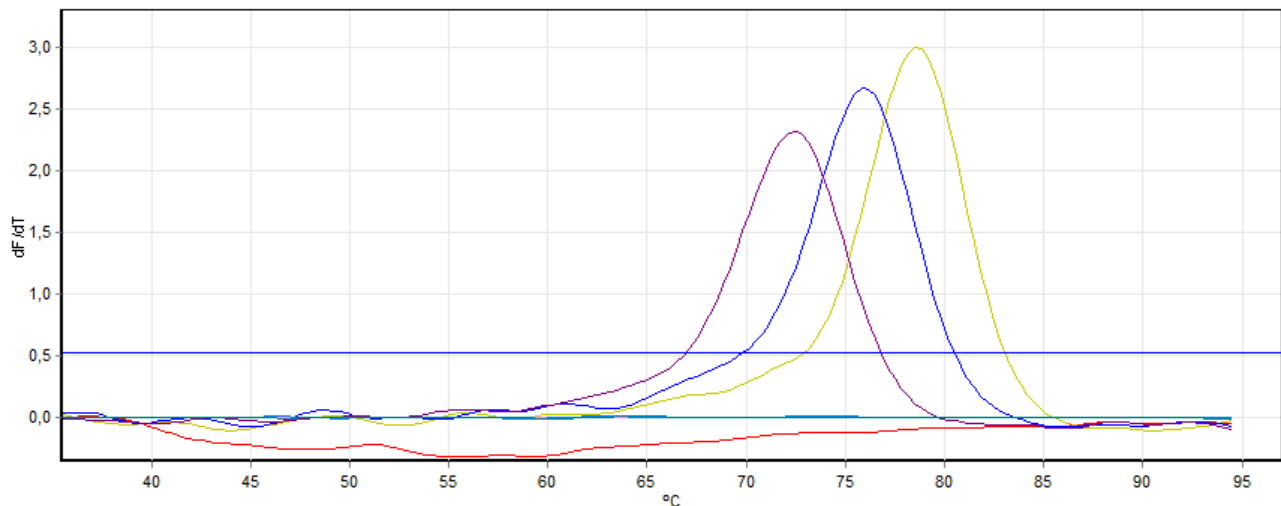
ACCCCGCATTACGTTTGGTGGATCC | hCoV-19/Denmark/ALAB-SSI480/2020|EPI\_ISL\_429559|2020-03-25

#### To danske stammer er blevet identificeret med en G -> T mutation ved position 22:

ACCCCGCATTACGTTTGGTGTACC | hCoV-19/Denmark/ALAB-SSI209/2020|EPI\_ISL\_429405|2020-03-10

ACCCCGCATTACGTTTGGTGTACC | hCoV-19/Denmark/ALAB-SSI201/2020|EPI\_ISL\_429399|2020-03-09

Effekten af de identificerede mutationer, på N1-probe-affiniteten, blev undersøgt ved brug af syntetisk DNA (Figur 2). T23ins og G22T mutationerne reducerer smeltetemperaturen fra henholdsvis 78.5°C (Gul linje) til 76°C (Blå) og 72.5°C (Lilla). På baggrund af disse data vurderes det, at effekten har ikke-signifikant betydning for analysens ydeevne.



**Figur 2.** Smelte-studier med CoviDetect™ COVID-19 Multiplex assay N1 probe og syntetiske DNA-streng, der indeholder T23Ins og G22T mutationerne som er blevet identificeret i danske SARS-CoV-2-stammer.

#### N2 Forward primer

AGGAACTGATTACAAACATTGGC

*Ingen mismatches fundet*

#### N2 Revers Primer

TGTAGGTCAACCACGTTCCC

*Ingen mismatches fundet*

#### N2 Probe

TGCACAATTTGCCCCAGCG

#### Fire danske stammer er blevet identificeret med en C -> T mutation ved position 16:

TGCACAATTTGCCCTAGCG hCoV-19/Denmark/alab-hh89/2020|epi\_isl\_429329|2020-03-15  
 TGCACAATTTGCCCTAGCG hCoV-19/Denmark/alab-ssi414a/2020|epi\_isl\_429512|2020-03-23  
 TGCACAATTTGCCCTAGCG hCoV-19/Denmark/alab-ssi413a/2020|epi\_isl\_429510|2020-03-23  
 TGCACAATTTGCCCTAGCG hCoV-19/Denmark/alab-ssi595/2020|epi\_isl\_429590|2020-03-28

*Betydningen af denne mutation på probe-affiniteten er i øjeblikket under undersøgelse.*

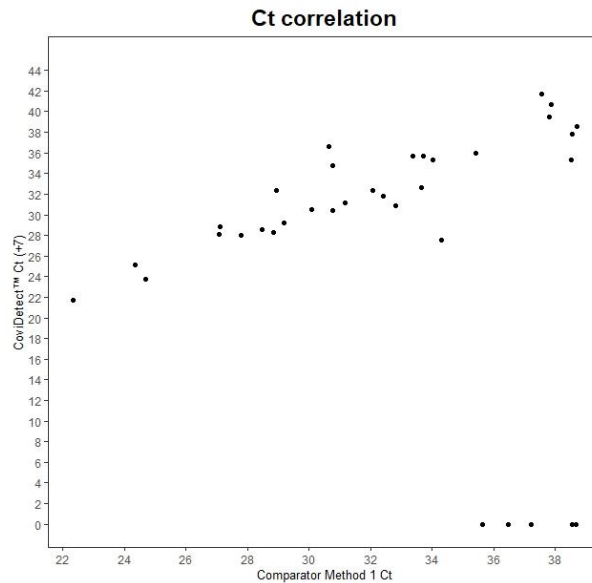
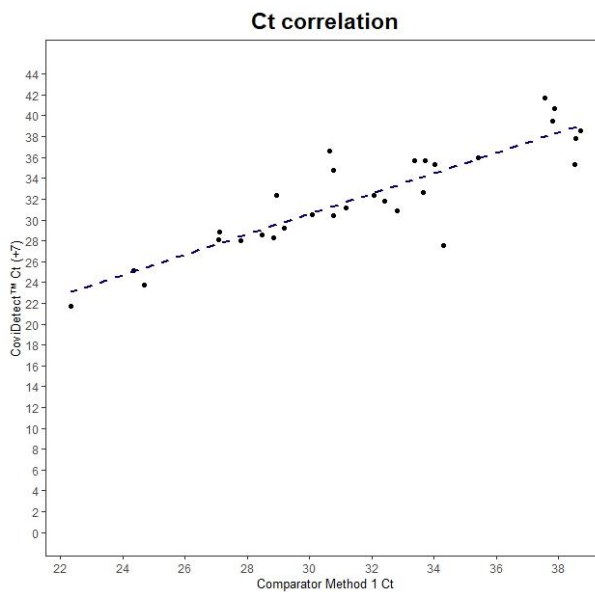
### 8.4 Klinisk evaluering

Den kliniske ydeevne for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay blev evalueret ved brug af resterende oropharyngeale podninger samt kliniske ekspektorat-prøver fra patienter, der mistænkte at have COVID-19. Prøverne var tidligere blevet analyseret for tilstedeværelse af SARS-CoV-2 ved at bruge den komparative RT-qPCR metode i et klinisk laboratorie i Danmark. Opbevarede prøver blev samlet til videre analyse ved brug af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay. Viral DNA and RNA Extraction Kit til BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument blev brugt til ekstraktion af RNA. RT-qPCR blev udført ved brug af CFX96 qPCR Detection System (BioRad) og dataanalysen udført ved brug af software version 3.1. Til analysen blev brugt standardanalyseindstillingerne, hvor tærskelværdien for FAM-kanalen blev sat til 100 RFU.

**Table 11.** Resume af klinisk evaluering af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af kohorte 1.

	Assay	CoviDetect™	Komparativ Metode 1	Overensstemmelse
Oropharyngeale podepinde	SARS-CoV-2 positiv	26	30	87% (PPA)
	SARS-CoV-2 negativ	55	51	100% (NPA)
Ekspektorater	SARS-CoV-2 positiv	4	5	80% (PPA)
	SARS-CoV-2 negativ	0	0	Ikke relevant

Ct-værdierne for CoviDetect™ (Ct + 7) sammenlignet med den komparative metode 1 af godkendte positive samt afvigende prøver er illustreret i Figur 3. Afvigende prøver er vist som datapunkter med CoviDetect™ Ct-værdier på 0. Grundet mangel på materiale var det ikke muligt at bekræfte resultaterne ved en tredje metode. Korrelationen af Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 1 af de delte positive prøver er vist i Figur 4.

**Figur 3.** Korrelationen af Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 1 ved brug af oropharyngeale podninger samt kliniske ekspektoratprøver (Kohorte 1). Afvigende cases er vist som datapunkter med CoviDetect™ Ct-værdier på 0.**Figur 4.** Korrelationen af Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 1 ved brug af oropharyngeale podninger samt kliniske ekspektoratprøver (Kohorte 1).

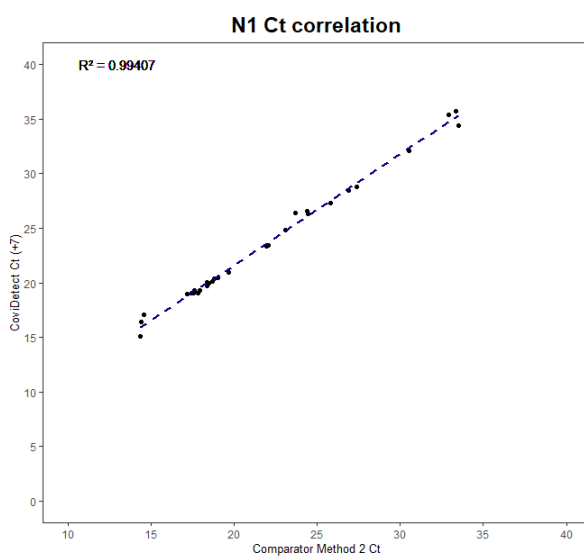


### 8.4.1 Kohorte 2

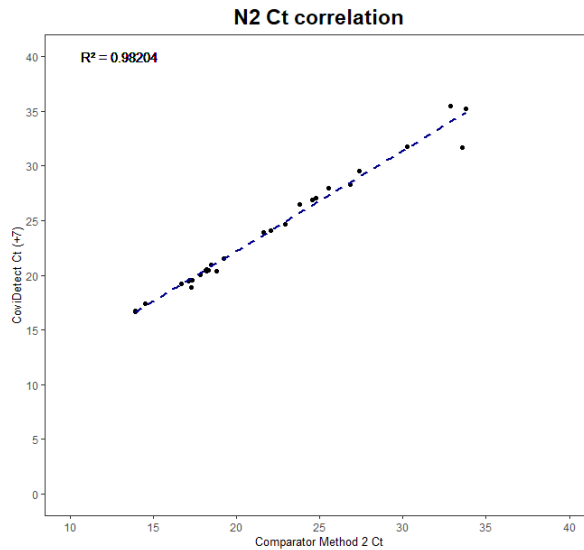
I kohorte 2 blev resterende prøver, fra nasopharyngeale podninger fra patienter mistænkt for at have COVID-19, ekstraheret ved brug af Viral DNA and RNA Extraction Kit til BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument. RT-qPCR blev udført ved at bruge CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay og den komparative metode 2 på BaseTyper™ qPCR Instrumentet. Til analysen blev brugt automatisk baseline- og tærskelværdiindstillinger. Evalueringsresume er vist i Tabel 12. Korrelationen af Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 2 er vist i Figur 5-7.

**Tabel 12.** Sammenligning af klinisk ydeevne for CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay relativt til IDT 2019-nCoV CDC EUA Kit ved brug af kohorte 2 prøver.

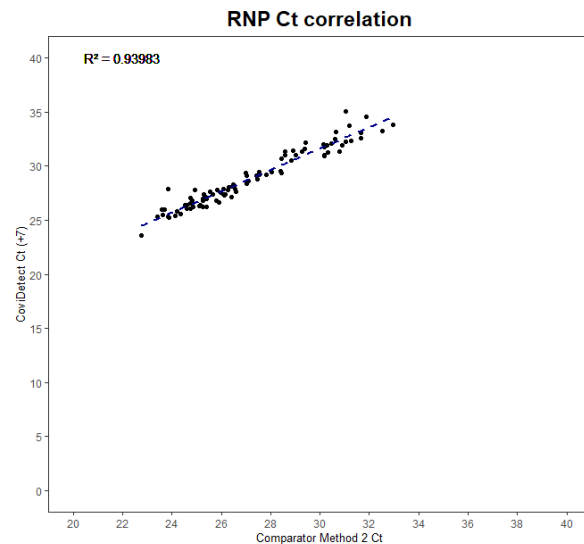
	Resultater	CoviDetect™	IDT 2019-nCoV CDC EUA Kit	overensstemmelse
Nasopharyngeal podepindeporøver	SARS-CoV-2 positiv	27	27	100% (PPA)
	SARS-CoV-2 negativ	62	62	100% (NPA)



**Figur 5.** Korrelation af N1 assayets Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 2 ved brug af resterende SARS-CoV-2 positiv oropharyngeale podninger (Kohorte 2).



**Figur 6.** Korrelation af N2 assayets Ct-værdier mellem CoviDetect™ den komparative metode 2 ved brug af resterende SARS-CoV-2 positiv oropharyngeale podninger (Kohorte 2).



**Figur 7.** Korrelation af RNP assayets Ct-værdier mellem CoviDetect™ og den komparative metode 2 ved brug af resterende oropharyngeale podninger (Kohorte 2).

## 9. Begrænsninger

- Udførelse af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er kun testet på biologiske prøver fra nasopharyngeale eller oropharyngeale podninger.
- Et negativt testresultat udelukker ikke infektion med SARS-CoV-2, og behandling af en patient skal ikke udelukkende baseres på testresultatet. Det kan være nødvendigt at indsamle flere podninger på forskellige tidspunkter fra samme patient for at detektere virusen, da det er uvist hvornår det virale niveau i kroppen er højest.
- Ukorrekt prøveindsamling, transport eller håndtering af prøverne kan give falsk-negative testresultater. En lav mængde virus RNA i prøven eller amplificeringsinhibitorer kan også give falsk-negative testresultater.
- Brug ikke reagenser der har overskredet udløbsdatoen.
- Hvis der opstår mutationer i den targeterede region af virusen (N1 og N2 markører) kan det have en effekt på sensitiviteten af testen og dermed resultere i falsk-negative resultater.
- Testen kan ikke udelukke at patienten er inficeret med andre vira eller bakterier.

## 10. Troubleshooting

Troubleshooting-guiden besvarer nogle af de mest stillede spørgsmål og problemer som kan opstå ved brug af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay og hvordan disse bør løses.

Tabel 13. Troubleshooting guide

Problem	Løsning
Intet ekstraktions-kontrol-signal	Sørg for at PCR-programmet er korrekt sat op og at instrumentet måler på FAM, HEX/VIC og Cy5 kanalerne i step 2 af Stage 4.
Intet prøve-signal	Koncentrationen eller kvaliteten af RNA i prøven er for lavt. Tilsæt mere prøve hvis muligt, eller indsaml nyt prøvemateriale fra en ny podning.
Signal i NTC (negativ control)	Sørg for at tærskelværdien er sat korrekt over baggrundsfluorescensen. Hvis dette er gjort, og der stadig ses signal i NTC. kan reagenserne være kontaminerede. Find grunden til kontaminering ved at tjekke og/eller fjerne alle potentielle kilder til kontaminering fx. pipetter og instrumenter. Hvis kontamineringen ikke kan lokaliseres, kontakt venligst PentaBase eller din lokale distributør.
Baseline drift	Baseline drift er et langsomt stigende signal på amplificeringskurven med ingen eller sen eksponentiel fase. Baseline drift kan ske hvis baseliningen ikke er foretaget korrekt. Det kan rettes ved at justere baseline-intervallet manuelt eller inkludere baseline drift korrektion i analyseindstillingerne. I begge tilfælde skal amplificeringskurven alignes så tæt på baseline som muligt, men uden at den eksponentielle fase ligger under baseline. Prøven skal køres om, hvis baseline drift ikke kan rettes og/eller der er nogen tvivl om kvaliteten af amplificeringskurven.










## 11. Bortskaffelse

Bortskaffelse af ubrugte kit reagenser, biologiske prøver og post-amplificerede PCR-rør/plader skal ske i henhold til lokale og statslige regulativer.

## 12. Symboler

Følgende symboler er brugt til mærkning af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR produkter.

Table 12. Symboler brugt til mærkning af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR produkter.

 Fremstillingsdato	 In vitro-diagnostisk medicinsk udstyr
 Sidste anvendelsesdato	 Genbrug ikke
 Indeholder tilstrækkelig til <n>	 Producent
 Temperaturgrænse	 Overensstemmelse af CE-mærkning: denne enhed er i overensstemmelse med krav til CR for in vitro-diagnostisk medicinsk udstyr
 Se brugsanvisningen	

## 13. Producenter og distributører

For teknisk assistance i Danmark venligst kontakt PentaBase ApS:

Petersmindevej 1A  
DK-5000 Odense, Danmark

**Telefon:** (+45) 36 96 94 96

**Email:** [support@pentabase.com](mailto:support@pentabase.com)

**Webpage:** [www.pentabase.com](http://www.pentabase.com)

For teknisk assistance i alle andre lande, kontakt din lokale distributør. En fuldstændig liste med distributører er tilgængelig på [www.pentabase.com](http://www.pentabase.com)